



Universidad
Zaragoza



TRABAJO DE FIN DE GRADO

Metabolismo energético de células de túbulo proximal humano

Autora:

Marina Sanz Gracia

Director/es:

Ignacio Giménez López

Patricia Meade Huerta

Grado en Biotecnología – Facultad de Ciencias

Curso 2019/2020

Índice

Resumen / abstract.....	Pág. 2
Introducción.....	Pág. 3
Materiales y métodos	Pág. 11
Resultados	Pág. 14
Discusión de resultados	Pág. 19
Conclusión	Pág. 20
Referencias	Pág. 22
Anexos.....	Pág. 24

Resumen

Las células del túbulo proximal se encargan de reabsorber la mayoría de los nutrientes filtrados en el glomérulo, para lo que requieren gran cantidad de energía. Por ello tienen un metabolismo principalmente oxidativo, utilizando en situaciones normales sustratos metabólicos diferentes de la glucosa, como los ácidos grasos, que proporcionan una mayor eficiencia energética. Este tipo de metabolismo las hace muy susceptibles al daño por hipoxia o isquemia, dos factores estrechamente relacionados con la aparición de enfermedades renales como la insuficiencia renal aguda (AKI) o la enfermedad renal crónica (CKD).

En este proyecto se realizó una recopilación bibliográfica con el fin de estudiar el metabolismo de las células del túbulo proximal humano, y de sentar los antecedentes de su susceptibilidad a hipoxia e isquemia y su relación con las enfermedades renales.

Además, se realizaron dos experimentos en relación con la hipoxia y la isquemia sobre células RPTEC-TERT1. Por un lado, se estudiaron los efectos de los factores de crecimiento en la susceptibilidad a la hipoxia de estas células. Los resultados obtenidos no mostraron ninguna influencia clara de los suplementos. Por otro lado, también se compararon los efectos de la hipoxia y la isquemia sobre las células RPTEC-TERT1, incubándolas durante 16h en hipoxia 1%, en medios con y sin glucosa. En este contexto también se simuló el efecto del *shear stress* mediante incubación sobre un balancín, comparándolo con un control que se mantuvo estático. Los resultados mostraron que la isquemia tenía consecuencias más negativas que la hipoxia sobre las células RPTEC, y que el *shear stress* aumentaba la viabilidad celular en ambas condiciones.

Abstract

The leading role of proximal tubule cells is to reabsorb most of the nutrients filtrated in the glomerulus; therefore, they require big amounts of energy. In consequence they have a dominant oxidative metabolism, using, in normal situations, metabolic substrates different from glucose, such as fatty acids, which provide a bigger energy efficiency. This type of metabolism makes them very sensitive to hypoxic or ischemic damage. These two factors are closely related to the development of renal diseases, such as acute kidney injury (AKI) or chronic kidney disease (CKD).

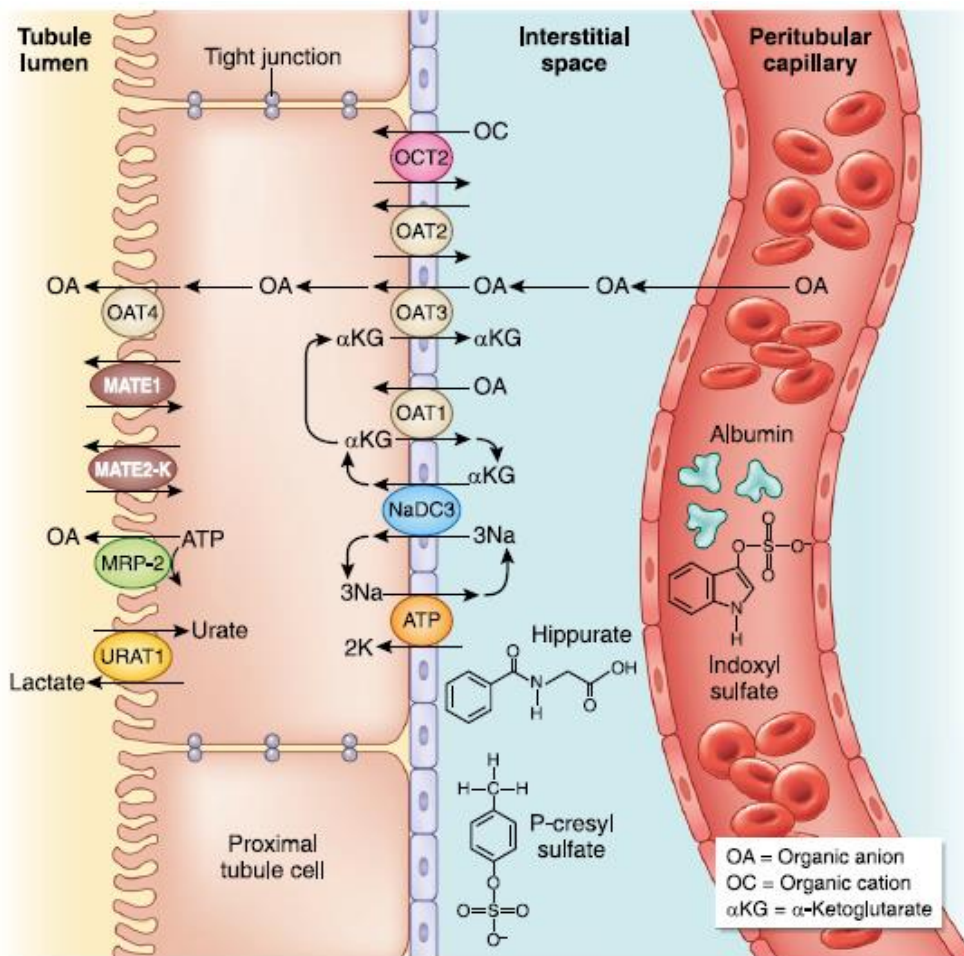
This essay begins with a review of bibliography, with the aim to study human proximal tubule cells' metabolism, and to set the background for their susceptibility to hypoxia and ischemia, and their relationship with renal diseases.

Next, two experiments were carried out testing hypoxia and ischemia effects on RPTEC-TERT1 cells. On one hand, we studied the effects of growth factors in the sensitivity to hypoxia in these cells. No clear influence was shown in the obtained results. On the other hand, we also compared the effects of hypoxia and ischemia in RPTEC cells, by culturing them during 16h in 1% hypoxia conditions, and in media with and without glucose. In this context we also stimulated the *shear stress* effect by culture on a rocker, comparing it with a control that stayed steady. The results showed how ischemia had more negative consequences than hypoxia in RPTEC cells, and that *shear stress* enhanced cell viability in both conditions.

Introducción

Los riñones son los órganos principales del sistema urinario. Su función primordial es filtrar la sangre, eliminando sustancias nocivas y reabsorbiendo nutrientes e iones necesarios para el organismo. Los riñones también se encargan de regular los niveles de pH, volumen, presión y osmolaridad de la sangre, y además tienen la capacidad de secretar hormonas como la eritropoyetina o la renina. Debido a su gran cantidad de funciones los riñones se encuentran entre los órganos del cuerpo más metabólicamente activos y que más energía requieren (1–3). Para poder suplir las altas demandas metabólicas cuentan con un gran número de mitocondrias, de forma que son el segundo órgano del cuerpo con mayor cantidad de estos orgánulos y mayor consumo de oxígeno, después del corazón (2,4)

El túbulo proximal (TP) es el segmento de la nefrona que se encarga de reabsorber la gran mayoría de los iones y nutrientes que han sido filtrados en el glomérulo, devolviéndolos a la sangre. La morfología de las células del túbulo proximal juega un importante papel a la hora de llevar a cabo su función. Las células del túbulo proximal son células polarizadas. En su superficie apical, que mira hacia el lumen del túbulo, cuentan con microvellosidades, aumentando así la superficie de absorción, y con ello, la captación de sustancias. En el otro lado de las células se encuentra la membrana basolateral, que da a los capilares peritubulares. Las microvellosidades están expuestas al paso de líquido por el lumen del túbulo, lo que ejerce una estimulación mecánica sobre ellas que se conoce como “*shear stress*”. Esta estimulación se ha visto que *in vivo* tiene algunos efectos sobre ellas, como un aumento del transporte de iones y de la endocitosis. (5–7)



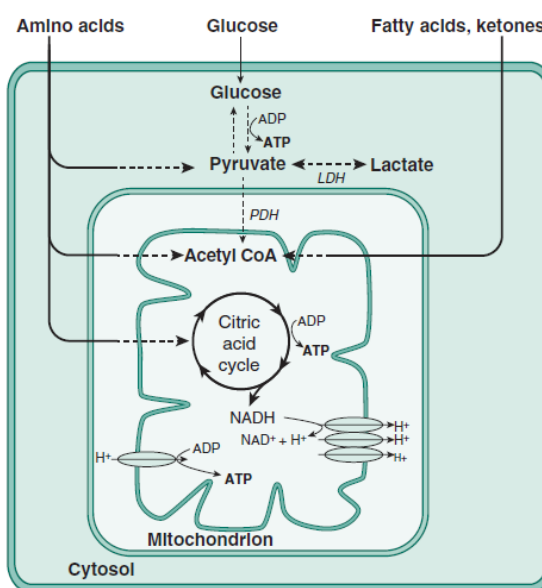
[Fig. 1]: **Esquema de los mecanismos de transporte en el túbulo proximal.** Por un lado, en el proceso de secreción, solutos como por ejemplo medicamentos, que van a ser eliminados de la sangre, pasan desde los capilares peritubulares hasta el interior de las células por medio de transportadores situados en la membrana basolateral. Finalmente, éstos son secretados al lumen del túbulo para posteriormente ser excretados por la orina. El mecanismo de reabsorción tiene lugar en la dirección inversa. El agua y los solutos que han sido filtrados en el glomérulo pero que son necesarios para el organismo se van a reabsorber por difusión o mediante transportadores en la membrana apical de las células del túbulo. Posteriormente atravesarán los transportadores de la membrana basolateral y el espacio intersticial para ser devueltos a la sangre. Imagen tomada del artículo 5.

Para llevar a cabo la reabsorción de nutrientes las células del túbulo proximal cuentan con gran cantidad de transportadores en sus membranas. El principal mecanismo de transporte activo, y del que depende casi toda la demanda metabólica del túbulo proximal, es la bomba de sodio-potasio ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPasa}$) que se encuentra situada en la membrana basolateral. Este transportador se encarga de mantener un gradiente de sodio positivo en las células, sacando al exterior 3 Na^+ e introduciendo 2 K^+ con gasto de ATP. (8) Este gradiente se utiliza para reabsorber, mediante cotransporte con sodio, moléculas que tienen utilidad para el organismo y que han sido filtradas en el glomérulo, como por ejemplo glucosa o aminoácidos, en la membrana apical. El transporte de sodio en las células del TP, además de apical y basal, también puede realizarse de forma paracelular, mediante transportadores situados en las uniones estrechas de las células.

Este transporte se realiza por unas proteínas transmembrana de la familia de las claudinas (Claudina-2) de forma pasiva sin gasto de energía. (8–11) Recientes estudios indican que este tipo de transporte es muy importante en el túbulo proximal ya que permite aumentar la eficiencia energética de estas células. Por ejemplo, en estudios realizados en ratones se ha observado que el silenciamiento de la claudina-2 deriva en una alteración del balance de sodio, que es compensado por una mayor reabsorción de este ion en el asa de Henle. La reabsorción en este punto se hace a costa de un aumento del consumo de oxígeno renal, pudiendo derivar en hipoxia y en una mayor susceptibilidad al daño renal por hipoxia (8).

El transporte de sodio en el TP está ligado por tanto al consumo de oxígeno y a la eficiencia metabólica (10). La mayor parte de la demanda metabólica proviene de la bomba de sodio-potasio, aunque también hay cierto consumo de ATP que no está asociado a este transportador. Una pequeña parte de la energía requerida por el túbulo proximal se destina a otros tipos de transporte, a las reacciones necesarias para el metabolismo basal celular, o se emplea para llevar a cabo la gluconeogénesis en situaciones de ayuno, hipoglucemia o diabetes. El túbulo proximal es la única parte de la nefrona capaz de realizar la gluconeogénesis, utilizando como sustrato principal el lactato. Esta capacidad le permite proporcionar glucosa como sustrato energético a otras partes más distales de la nefrona, donde ésta es imprescindible para su metabolismo (1,10,12,13). *In vitro*, sin embargo, se ha visto que la glucosa es a veces utilizada como sustrato metabólico, aunque en baja medida (10).

Las demandas energéticas de las células van variando a lo largo de toda la nefrona. Los procesos llevados a cabo son distintos en las diferentes partes del riñón, y por tanto lo es también su necesidad energética y de oxígeno, y el tipo de metabolismo principal y los sustratos utilizados por cada tipo de célula. Las células del túbulo proximal consumen aproximadamente el 70-80%



[Fig. 2]: **Esquema de los sustratos metabólicos utilizados en las células del túbulo proximal y la producción de ATP.** El sustrato principal de estas células son los ácidos grasos, aunque también se pueden metabolizar otras moléculas como aminoácidos, cetonas, piruvato, lactato, o, en menor medida, glucosa. La oxidación de todos ellos se completa en la mitocondria por medio de la fosforilación oxidativa, que da grandes cantidades de ATP. Figura tomada del artículo 1.

de la energía total requerida por el riñón. A pesar de que en el TP se reabsorbe toda la glucosa filtrada en el glomérulo (en situaciones no patológicas), ésta apenas se utiliza como sustrato metabólico, dependiendo fundamentalmente de otros compuestos más eficientes, como ácidos grasos, lactato y glutamina. (1,7,9,10,12,14–17)

Los ácidos grasos son el principal combustible metabólico de las células del túbulo proximal. Éstos llegan a ellas por la membrana basolateral, y son oxidados en las mitocondrias y peroxisomas. Los ácidos grasos de cadena corta y media son oxidados vía mitocondrial, y los de cadena larga o muy larga vía peroxisomal, pero ambos orgánulos lo hacen mediante la beta-oxidación (18). El primer paso de la oxidación de ácidos grasos es su activación con CoA en el citosol. La membrana mitocondrial es impermeable a los ácidos grasos, por lo que, para poder entrar a su interior, han de utilizar el transportador de carnitina situado en ella. Una vez los ácidos grasos han sido activados, la molécula de acil-CoA se conjuga con carnitina por medio de la carnitina aciltransferasa I. La molécula de acil-carnitina resultante es trasladada al interior mitocondrial, y una vez dentro, se vuelve a transformar en acil-CoA gracias a la carnitina aciltransferasa II. Este proceso se realiza para ácidos grasos de una longitud de entre 12 y 18 carbonos. Una vez los ácidos grasos se encuentran en el interior de la mitocondria ya se puede llevar a cabo su catabolismo mediante la beta-oxidación, proceso que cuenta con cuatro reacciones sucesivas. Los ácidos grasos de cadena mayor de 18C son acortados en el peroxisoma por beta-oxidación, pero terminan su oxidación completa en las mitocondrias (18).

Comparando la energía que aporta cada sustrato podemos decir que la oxidación completa de una sola molécula de ácido graso, como por ejemplo el ácido palmítico (C16:0), puede dar lugar a 106 moléculas de ATP, frente al máximo de 36 ATP que puede proporcionar la oxidación de una molécula de glucosa. Esta es la razón por la que, en el túbulo proximal, que requiere una alta cantidad de energía para poder desempeñar sus funciones, se confía en sustratos diferentes a la glucosa. Las células del TP, por tanto, tienen un metabolismo principalmente aerobio, y, por consiguiente, poseen un gran número de mitocondrias y requieren altas cantidades de oxígeno (1–3,7,15,18).

Su tipo de metabolismo y el elevado número de mitocondrias que poseen hacen a las células del túbulo proximal altamente eficientes energéticamente hablando. Sin embargo, estas características también provocan que sean células muy sensibles a los niveles de oxígeno, y, en consecuencia, se vean rápidamente perjudicadas en situaciones de hipoxia (2,13,18,19). La hipoxia es una situación patológica en la que, en

este caso, las células del túbulo proximal se ven desprovistas de una concentración de oxígeno adecuada. Además, cabe destacar que el riñón en sí es un órgano ineficiente en cuanto al uso de oxígeno, se calcula que el riñón no toma más del 10% del oxígeno que llega a él por la arteria renal; por lo tanto, esto también afecta a la sensibilidad a hipoxia en el TP (13,20).

La hipoxia, junto con la isquemia y la nefrotoxicidad, es la principal causa de la insuficiencia renal aguda, o AKI (Acute Kidney Injury), por sus siglas en inglés (12,21). La insuficiencia renal aguda es una patología asociada con altas cifras de mortalidad, y su incidencia parece que va en aumento. La AKI se define como una disminución en la tasa de filtración glomerular (TFG), y se suele desarrollar de forma rápida, generalmente ocurre en cuestión de horas o días. Se puede clasificar etiológicamente en tres tipos: prerrenal, si el daño se encuentra antes del riñón, postrenal, después del riñón, o intrarrenal, donde el problema aparece en el propio riñón. En este último caso se encuentran los daños en el túbulo proximal (12).

El daño tubular principalmente se debe a la necrosis aguda de sus células, cuyas dos causas principales son la isquemia y la nefrotoxicidad. En el caso de la isquemia hay ausencia o descenso del nivel de sangre que llega a las células del túbulo, generalmente debido a causas prerrenales. Al no llegar sangre a la zona, también habrá una falta de suministro de oxígeno y nutrientes, así como una acumulación de sustancias metabólicas de desecho, que finalmente provocarán daño o muerte celular (12,20,21).

Una de las primeras manifestaciones de daño celular que aparecen en estos casos es la pérdida del borde en cepillo, debido a la descomposición de elementos del citoesqueleto, y por lo que las funciones de las células del TP se ven mermadas en poco tiempo. Los daños celulares en el túbulo proximal pueden ser reversibles si el tiempo de exposición a hipoxia o isquemia no es muy prolongado. Sin embargo, en un periodo más largo en estas condiciones el problema tiende a cronificarse, pasando de AKI a enfermedad crónica renal, o CKD (Chronic Kidney Disease) (12,20–22). A pesar de que la función renal puede recuperarse, muchos pacientes que sufren daño renal agudo terminan manifestando a lo largo del tiempo la enfermedad crónica. En concreto, los niños que sufren AKI tienen un alto riesgo de desarrollar CKD (12,23). Se ha observado además cómo el daño renal aumenta el riesgo de muerte en pacientes que padecen otras patologías. Por ejemplo, el daño agudo lleva a un aumento de la permeabilidad vascular pulmonar y cerebral. Esto conduce a inflamación de estos órganos, o a daños en células del sistema nervioso. También se han observado afecciones ligadas a AKI

en el corazón, como apoptosis de miocitos, o una disminución de la contracción cardíaca (12,20).

Algunos de los mecanismos que contribuyen a la enfermedad crónica renal son: disfunción mitocondrial y peroxisomal, estrés oxidativo, cambios en autofagia, inflamación crónica, disfunción vascular, alteraciones en los mecanismos de transporte, etc. Todos ellos están relacionados con la isquemia y la hipoxia, y se manifiestan en el daño renal (12,18,24,25). La hipoxia crónica puede ser inducida por diversos factores en pacientes con CKD: Pérdida de capilares peritubulares, fibrosis tubulointersticial, reducción del flujo sanguíneo renal, aumento de la demanda de oxígeno renal por condiciones como hipotermia, estrés oxidativo, anemia renal, etc. La hipoxia en AKI o en CKD es por tanto causa y a la vez consecuencia de estas enfermedades (20,24,26).

La disfunción mitocondrial y peroxisomal juega un importante papel en el desarrollo de enfermedades renales (2,3). Estudios previos respaldan la existencia de estas alteraciones tras el daño isquemia-reperfusión, o IRI (Ischemia Reperfusion Injury, por sus siglas en inglés), o tras problemas de nefrotoxicidad (18). En concreto en la insuficiencia renal aguda se han observado inflamación y fragmentación de las mitocondrias y formación de poros en sus membranas. A pesar de las evidencias de que la disfunción mitocondrial es uno de los procesos claves en el desarrollo de enfermedades renales, especialmente en la CKD, la identificación de los mecanismos exactos que contribuyen a estas patologías todavía es una tarea pendiente de estudiar. La dificultad para esclarecer estos aspectos radica en que la interacción entre las mitocondrias y las enfermedades renales parece variar en función del tipo de problema mitocondrial que se presente, de las condiciones, y de la población examinada o el modelo estudiado, además de la heterogeneidad metabólica dentro de la nefrona (4).

Ligado a los problemas en las mitocondrias y peroxisomas, aparece un descenso en la capacidad de beta-oxidación y en la producción de ATP, un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, y se produce una liberación de citocromo C al exterior. El descenso en los niveles de ATP también está ligado a la limitada capacidad glucolítica del riñón. Como se ha comentado, la oxidación de los ácidos grasos es la principal fuente energética del TP, y éste apenas es capaz de utilizar la glucosa como sustrato metabólico. Al existir daño en las mitocondrias, la beta-oxidación se verá también afectada, y con ello la producción de energía. El metabolismo oxidativo no podrá llevarse a cabo, teniendo que recurrir a vías de obtención de energía anaerobias, como la glucólisis. Además de tener un muy bajo aporte de ATP, la glucólisis apenas tiene lugar en las células del túbulo proximal, de forma que no se alcanzarán los niveles mínimos

requeridos de energía, derivando en una alteración de las funciones celulares y de la estructura, que finalmente llevan a la pérdida de funciones renales. (2,3,21,27–29)

Las alteraciones mitocondriales y peroxisomales están estrechamente relacionadas con las especies reactivas de oxígeno. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen constantemente durante el consumo mitocondrial de oxígeno para obtener energía, y dentro de la célula ha de haber un balance entre su producción y su eliminación. Una disfunción mitocondrial da lugar al desequilibrio de dicho balance, y al aumento de las especies reactivas de oxígeno, de forma que la célula sufre estrés oxidativo. Se ha observado una estrecha relación entre la hipoxia y las ROS en las enfermedades renales (2,24). Un aumento del estrés oxidativo deriva en un aumento del consumo de oxígeno en las células, y con ello, en hipoxia. Por otro lado, se ha visto cómo la hipoxia renal magnifica el estrés oxidativo, entrando así en un círculo vicioso. Tanto el estrés oxidativo como la hipoxia juegan un papel crucial en la patogenicidad del daño agudo y en la transición de AKI a CKD (24).

Por su parte, la isquemia también está estrechamente relacionada con las especies reactivas de oxígeno. El daño isquemia-reperfusión, o IRI, es un proceso que se divide en dos fases. En primer lugar, se produce isquemia, de forma que no hay irrigación sanguínea en la zona afectada (en este caso nos centramos en el túbulo proximal). La falta de riego sanguíneo evita, por un lado, la llegada de nutrientes u oxígeno a las células, y por otro, la eliminación de sustancias de desecho o intermediarios metabólicos, los cuales se pueden acumular llegando a ser tóxicos. En segundo lugar, se produce lo que se conoce como reperfusión. En este momento vuelve a llegar la sangre a la zona, y con ella, el oxígeno y los nutrientes. Este oxígeno puede reaccionar con los sustratos metabólicos que se habían acumulado, dando lugar a la formación de ROS y produciendo así estrés oxidativo en las células (30). Algunos estudios han reportado la reducción de la actividad enzimática peroxisomal en al menos un 50%, después de 45 minutos de isquemia y 24h de reperfusión, así como un descenso en la actividad y expresión de las enzimas implicadas en la oxidación de ácidos grasos, tanto mitocondrial como peroxisomal, en cultivos de células de túbulo proximal (18). Otros estudios también sugieren que los riñones pueden responder a la IRI alterando el tipo de sustratos metabólicos utilizados para la obtención de energía, con el fin de mantener la funcionalidad celular. Por ejemplo, se ha observado cómo, en células de túbulo proximal, aparecían mayores niveles de enzimas implicadas en la glucólisis después de la exposición a isquemia (2,29).

Las mitocondrias tienen un importante papel en la biosíntesis de macromoléculas, en la regulación del estado redox de la célula, o en procesos como la homeostasis de calcio, procesos de inflamación, o vías de muerte celular. Estos orgánulos son capaces de detectar en el ambiente las alteraciones en el balance de nutrientes, acumulación de ROS, o la concentración de oxígeno. A raíz de ello pueden desencadenar una serie de procesos de protección frente a esos estímulos para poder mantener su funcionalidad y evitar el daño celular (2,4). Uno de los factores implicados en el mantenimiento de dicha funcionalidad mitocondrial es el coactivador PGC-1 α , muy expresado en tejidos con altas demandas metabólicas, como el riñón. PGC-1 α no se une directamente al DNA, pero sí que interacciona con factores de transcripción, coactivándolos para que puedan ejercer sus efectos reguladores. De esta forma se consiguen controlar muchos genes mitocondriales que regulan la biogénesis mitocondrial, la respiración, la beta-oxidación, el ciclo de Krebs, y la fosforilación oxidativa (4).

Por otro lado, entre los principales mecanismos de regulación y adaptación a la hipoxia encontramos al Factor Inducible por Hipoxia (HIF-1 α en el caso del túbulo proximal). Su actividad está mediada por la enzima que lo degrada (prolil-hidroxilasa), proteína que es dependiente del oxígeno para llevar a cabo su función. En situaciones normales HIF es degradado y se encuentra en bajas concentraciones, sin embargo, ante un descenso del nivel de oxígeno, la prolil-hidroxilasa no puede catalizar la reacción de su degradación, de forma que el factor se acumula. HIF-1 α activa entonces genes con elementos de respuesta a hipoxia (20,24,31). Entre los procesos que se activan encontramos una mayor expresión del transportador de glucosa GLUT-1 y un consiguiente aumento de la absorción de glucosa, un aumento de la eritropoyesis y angiogénesis, y una disminución del estrés oxidativo, mediante la inhibición de la producción de ROS y la mejora de la detoxificación. También se ha visto cómo HIF optimiza la eficiencia de la respiración mitocondrial, bajando la producción de especies reactivas de oxígeno y aumentando la de ATP (24).

En resumen, la isquemia y la hipoxia son dos de las principales causas de las enfermedades renales y por ello conviene estudiarlas, especialmente en el túbulo proximal, ya que es una de las zonas más afectadas en estas patologías. A pesar de esta importancia, en la literatura aparecen muy pocos artículos que comparen directamente ambas condiciones en el ámbito renal. En otros órganos del cuerpo como el cerebro o el corazón sí que se ha estudiado este campo (32,33).

Teniendo en cuenta todo lo anterior en este proyecto se pretende, además de estudiar el metabolismo de las células del túbulo proximal, comparar las diferencias entre la

hipoxia y la isquemia en células del túbulo proximal humano, y los efectos del *shear stress* o de los factores de crecimiento en estas circunstancias. Para ello se emplearon modelos *in vitro*, con una línea celular de túbulo proximal humano (RPTEC-TERT1).

Materiales y métodos

Revisión bibliográfica: metabolismo de las células del túbulo proximal y patologías renales.

La bibliografía ha sido buscada en bases de datos como PubMed y Google Scholar. En una primera búsqueda se utilizaron las palabras clave “*Hypoxia*”, “*Proximal tubule*”, “*RPTEC cells*”, “*Renal*”, “*Human*”, “*Ischemia*”, “*Metabolism*”, “*Energy metabolism*”, “*Glucolysis*”, “*Mitochondria*”, “*IRI*”, “*AKI*”, “*CDK*”, y las diferentes combinaciones de las mismas. La búsqueda se acotó por fecha (2014-2020), y se recopilaron tanto artículos científicos como revisiones bibliográficas. Se realizó una segunda búsqueda con los mismos criterios, ampliando el rango de fecha desde 2010. Las posteriores recopilaciones de artículos se realizaron a raíz de los documentos seleccionados en las primeras búsquedas, empleando los filtros “artículos relacionados” y “citas recibidas”, así como a través de la bibliografía de los mismos.

Para organizar la bibliografía se utilizaron los programas Zotero y Mendeley.

Cultivo celular.

Las células utilizadas en este estudio para llevar a cabo los experimentos *in vitro* son las RPTEC-TERT1. Se trata de una línea de células renales epiteliales de túbulo proximal humano (RPTEC) inmortalizada usando la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT) (34). A la hora de ser manipuladas las células deben permanecer en campana de flujo laminar y los medios y materiales que se pongan en contacto con ellas han de ser completamente estériles. Los subcultivos celulares se han de mantener en una estufa a 37°C con 5% de CO₂, y en medio BioWest 5 (BW5C) [Tabla 1]. Cada pase ha de sembrarse en un *flask* 25F (*flask* de 25cm²) con una densidad igual o superior a 5,2 x 10⁴ células/cm² en 6mL de medio. Se recomienda el no superar los 45-50 pases para mantener la estabilidad de las células.

Efecto de la hipoxia en células RPTEC, mantenidas con o sin factores de crecimiento.

Las células RPTEC-TERT1 fueron cultivadas en placas de 96 pocillos de fondo plano, en medio BioWest 5 (BW5C) [Tabla 1]. En cada placa se sembró una densidad de 6,25 x 10⁴ células/cm². Las placas se mantuvieron en un incubador (Thermo Scientific) en

condiciones de normoxia, a 37°C y 5% de CO₂, con cambio de medio cada dos días hasta su confluencia. Una vez confluentes (5 días después de ser sembradas) se dividieron en dos grupos: Uno de ellos se mantuvo con el medio BW5 con suplementos y al otro se le cambió el medio a BW5 sin suplementos [Tabla 2]. Se mantuvieron 24h en condiciones de normoxia a 37°C y con un 5% de CO₂. Tras las 24h de tratamiento se realizó un Presto Blue inicial en condiciones de esterilidad. Tras ello se les cambió el medio (BW5C y BW5 sin suplementos, respectivamente) y se dejaron en un incubador a 37°C en condiciones de hipoxia 1% durante 16h. Por último, se realizó un Presto Blue final seguido de un ensayo con cristal violeta. Se realizaron cinco réplicas del experimento.

Simulación del efecto isquemia/hipoxia.

Las células RPTEC-TERT1 fueron cultivadas en 2 IBIDI, en medio BioWest 5 (BW5C) [Tabla 1]. En cada IBIDI se sembró una densidad de $1,5 \times 10^6$ células por canal. Los IBIDI se mantuvieron en un incubador en condiciones de normoxia, a 37°C y 5% de CO₂, con cambio de medio diario hasta su confluencia. Una vez confluentes (7 días después de ser sembradas) se midió su viabilidad celular mediante Presto Blue en condiciones de esterilidad. Tras ello, las células se dividieron en dos grupos: Por cada IBIDI se cambió el medio en tres canales por BW0 [Tabla 3] (medio sin glucosa), y los otros tres canales restantes se mantuvieron con el medio BW5C (5 mM de glucosa). De esta forma, en los canales sin glucosa se imitaba el efecto de la isquemia, donde, además de no llegar oxígeno, tampoco llegan nutrientes. Acto seguido, se dejaron en un incubador a 37°C en condiciones de hipoxia 1% durante 16h. Para simular el efecto del *shear stress* uno de los IBIDI se colocó en un balancín que se movía de forma intermitente, permitiendo así la difusión de medio entre los canales, ejerciendo un estímulo mecánico sobre las células, aunque de forma no continuada. El otro IBIDI se mantuvo estático, por lo que no había difusión del medio y las células no sufrían el efecto del *shear stress*. Después de las 16h de hipoxia se realizó un ensayo de viabilidad celular final mediante Presto Blue, seguido de otro ensayo con cristal violeta. Se realizaron dos réplicas del experimento.

Ensayos de viabilidad celular: Presto Blue.

En primer lugar, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con HBSS (80 µL por canal de IBIDI, 100 µL por pocillo), atemperado a 37°C, dos veces. Seguidamente, se preparó una dilución 1:20 de solución de Presto Blue (Life technologies A13262) y medio BW5C. Esta dilución se añadió a las células (50 µL por canal de IBIDI, 80 µL por pocillo de placa 96). La misma dilución se añadió también, en los volúmenes

correspondientes, a pocillos/canales vacíos para tomarlos como blanco. Se dejó incubar 30 minutos a 37°C. La lectura se realizó a 37°C en un lector multiplaca (BioTek Synergy HT), con el software Gen5. El tiempo de lectura fue de 1h para las placas de 96 pocillos y de 20 minutos para los IBIDI. Se midió la fluorescencia (excitación 528/20; emisión 590/35).

Ensayo Cristal Violeta

Se retiró el medio y se lavaron las células con HBSS dos veces. Las células se fijaron a temperatura ambiente con metanol frío durante 10 minutos, y seguidamente se lavaron con PBS dos veces. Tras ello se añadió el Cristal Violeta (Sigma C0775) (50 µL por canal de IBIDI, 80 µL por pocillo de placa 96) y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras el tiempo de incubación las placas y los IBIDI se lavaron en agua destilada y se dejaron secar completamente. Finalmente, se añadió ácido acético 10% (50 µL IBIDI, 80 µL placa 96) y se incubó en agitación durante 20 minutos. Se realizó una lectura de la absorbancia a 590nm en el lector multiplaca con el software Gen5.

Medio con suplementos BW5C (Volumen total ≈ 500 mL)

Medio	mL	Suplementos
BW0	350	1-7 y 9 (250µL)
BW17	150	8 (500µL)
Glutamax	5	
HEPES	10	

[Tabla 1]. Las referencias y concentraciones de los medios y reactivos se encuentran en el [Anexo 1]

Medio sin suplementos BW5 (Volumen total ≈ 300 mL)

Medio	mL	Suplementos
BW0	210	0
BW17	90	0
Glutamax	3	
HEPES	6	

[Tabla 2]: Las referencias y concentraciones de los medios y reactivos se encuentran en el [Anexo 1]

Medio con suplementos BW0 (Volumen total \approx 150 mL)

Medio	mL	Suplementos
BW0	150	1-7 y 9 (250 μ L)
BW17	0	8 (500 μ L)
Glutamax	1,5	
HEPES	3	

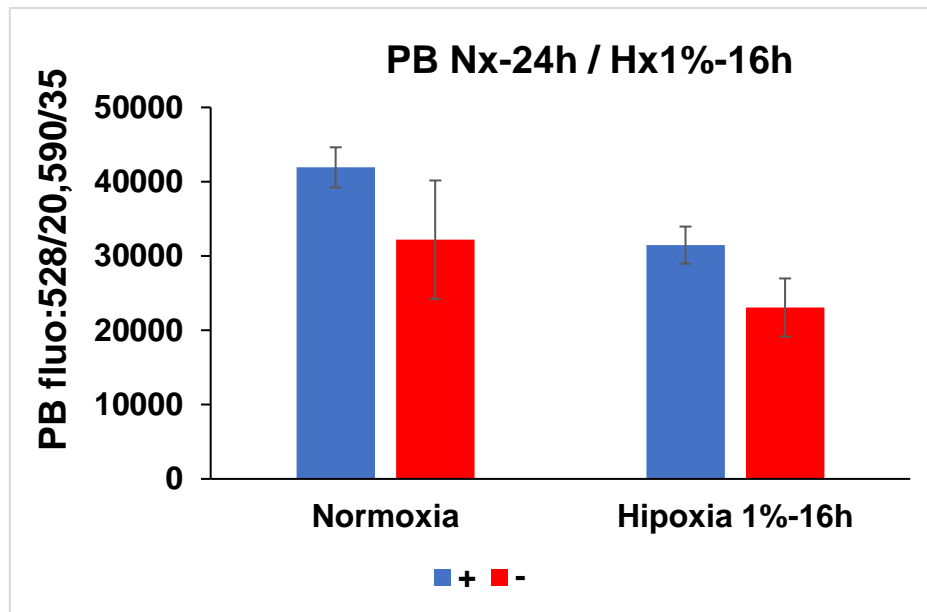
[Tabla 3]: Las referencias y concentraciones de los medios y reactivos se encuentran en el [Anexo 1]

Resultados

1. Efecto de los factores de crecimiento sobre la sensibilidad a hipoxia de las células RPTEC.

La viabilidad de las células RPTEC-TERT1 se estimó mediante Presto Blue. Un grupo de células fueron mantenidas en presencia de medio BW5 con suplementos y otras en BW5 sin suplementos, durante 24h en normoxia. A continuación, se expusieron todas a 16h en hipoxia 1%. Los resultados se presentan en la figura [Fig. 3], como la media de los valores absolutos obtenidos en 4 réplicas independientes del experimento. Se excluyeron los resultados de una de las réplicas, ya que eran valores atípicos.

También se calculó la tasa de supervivencia para cada muestra, y su media [Tabla 4]. En este caso tampoco se tuvieron en cuenta los resultados de la muestra 200214.



[Fig. 3]: **Efecto de los suplementos sobre la sensibilidad a hipoxia de las células RPTEC.**

Células RPTEC-TERT1. Muestras 200217, 200221a, 200223, 200226. Azul: Con suplementos, rojo: sin suplementos.

Células RPTEC-TERT1 sometidas a tratamiento con/sin suplementos. Determinación de la viabilidad celular mediante Presto Blue (Life technologies A13262) a las 24h de aplicar el tratamiento, y tras 16h sometidas a hipoxia 1%.

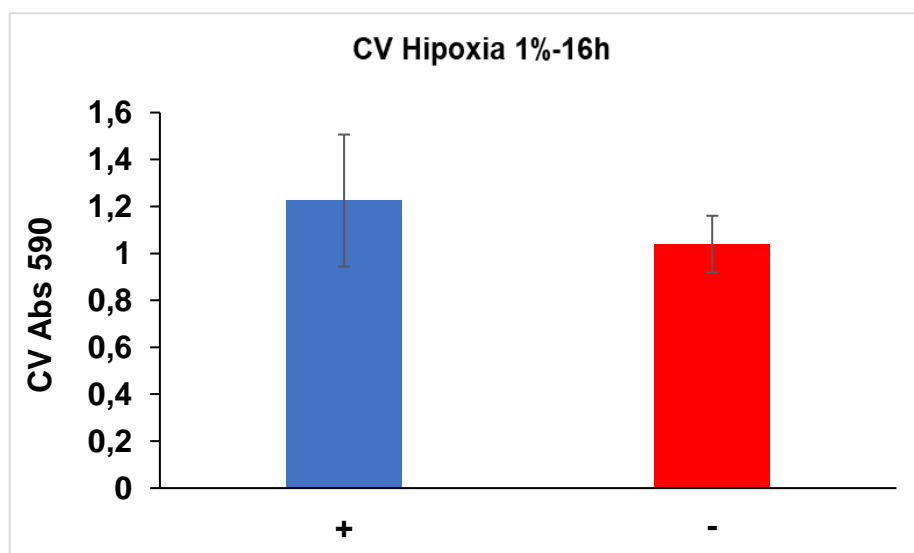
Datos representados como promedio de la fluorescencia +/- error estándar de las muestras con suplementos/sin suplementos en ambas condiciones.

Muestra	PB-200214	PB-200217	PB-200221a	PB-200223	PB-200226
Tasa de supervivencia +	102,03%	43,00%	84,34%	86,19%	90,68%
Tasa de supervivencia -	100,58%	48,63%	84,81%	73,58%	83,44%
Media tasa de supervivencia +					76,05%
Media tasa de supervivencia -					72,61%
SD Tasa de supervivencia +					22,19%
SD Tasa de supervivencia -					16,75%

[Tabla 4]: **Valores de las tasas de supervivencia de las muestras, su media, y su desviación típica.**

Células RPTEC-TERT1. Tasa de supervivencia estimada como la viabilidad tras 16h de hipoxia 1% entre la viabilidad tras 24h en normoxia. Valores expresados en porcentaje.

Para normalizar los resultados de viabilidad celular obtenidos también se cuantificó el número de células mediante un ensayo con Cristal Violeta, después de realizar el Presto Blue final. Los resultados obtenidos se reflejan en la figura [Fig. 4], como la media de los valores absolutos de absorbancia obtenidos en 3 réplicas independientes del experimento. No se tuvieron en cuenta los resultados de una de las muestras por valores atípicos, ni de otra por errores a la hora de llevar a cabo el protocolo.



[Fig. 4]: **Efecto de los suplementos sobre la sensibilidad a hipoxia de las células RPTEC.**

Células RPTEC-TERT1. Muestras 200221a, 200223, 200226. Azul: Con suplementos, rojo: sin suplementos.

Células RPTEC-TERT1 sometidas a tratamiento con/sin suplementos. Estimación de la cantidad de células mediante Cristal Violeta (Sigma C0775) tras 16h en hipoxia 1%.

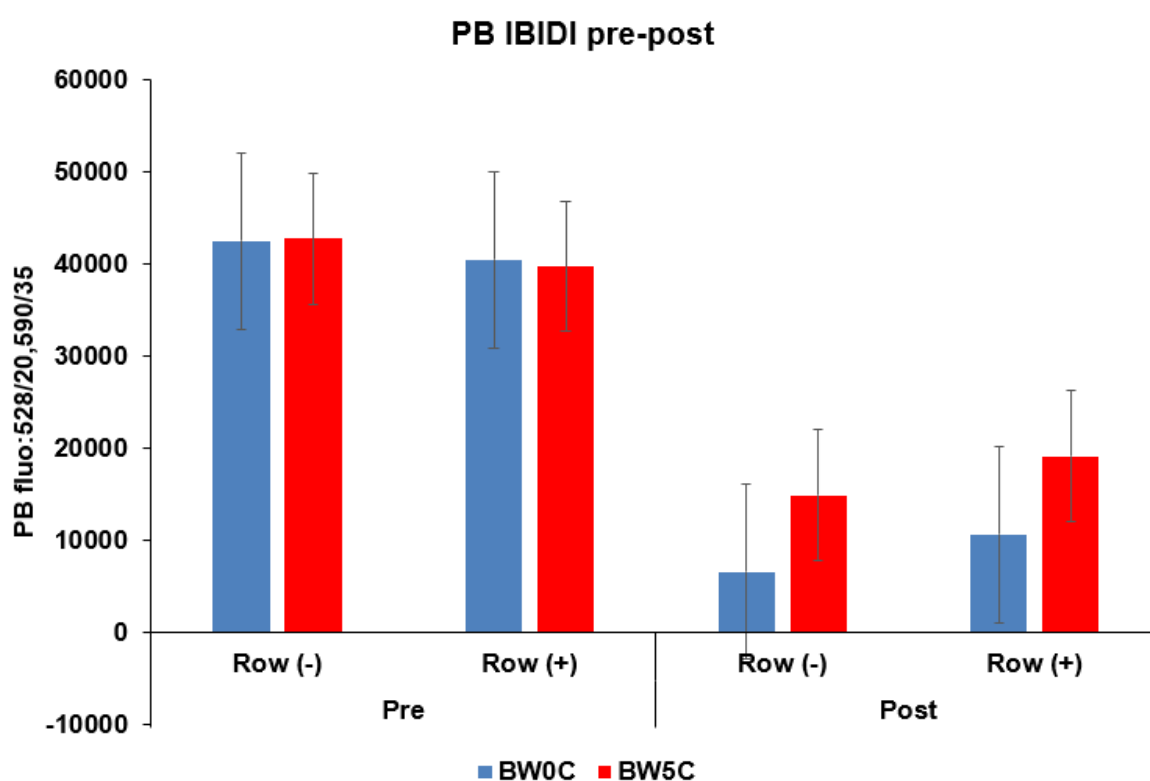
Datos representados como promedio de la absorbancia +/- error estándar de las muestras con suplementos/sin suplementos.

En la gráficas [Fig. 3] y [Fig. 4] podemos ver cómo aquellas células cultivadas sin factores de crecimiento sobreviven menos que las cultivadas en medio BW5C, tanto en normoxia como en hipoxia.

A la hora de comparar la tasa de supervivencia de las células cultivadas con frente a sin suplementos [Tabla. 4], se observa que los porcentajes son muy próximos. El valor de supervivencia es ligeramente más bajo en el caso de las células sin suplementos, aunque la diferencia no llega a ser del todo significativa (aprox. 4%). Es decir, la ausencia de suplementos disminuye la viabilidad celular, pero lo hace prácticamente en la misma proporción en ambos casos, por tanto, a priori, los suplementos no parecen tener un efecto significativo en la supervivencia de las células en hipoxia.

2. Comparación de los efectos de la isquemia y la hipoxia.

La viabilidad de las células RPTEC-TERT1 se estimó mediante Presto Blue. Una vez confluentes se determinó su viabilidad inicial. Posteriormente las células se dividieron en dos grupos: Unas se mantuvieron en medio sin glucosa BW0 (isquemia), y otras en medio con glucosa BW5 (hipoxia). Los dos IBIDI se mantuvieron durante 16h en condiciones de hipoxia al 1%. Uno de ellos se mantuvo estático, y el otro se situó en un balancín que se movía de forma intermitente (*shear stress*). Los resultados de la viabilidad se presentan en la figura [Fig. 5], como la media de los valores obtenidos en las dos réplicas independientes del experimento.



[Fig. 5]: **Comparación de los efectos de la isquemia y la hipoxia**

Células RPTEC-TERT1. Muestras 200221b, 200203. Azul: Medio sin glucosa (BW0C), rojo: Medio con glucosa (BW5C). "Row (-)": IBIDI estático, "Row (+)": IBIDI en balancín.

Células RPTEC-TERT1 sometidas a tratamiento con/sin glucosa y 16h de hipoxia 1%. Determinación de la viabilidad celular mediante Presto Blue (Life technologies A13262) antes de aplicar el tratamiento, y después de aplicar el tratamiento y de 16h sometidas a hipoxia 1%.

Datos representados como promedio de la fluorescencia +/- error estándar de las muestras.

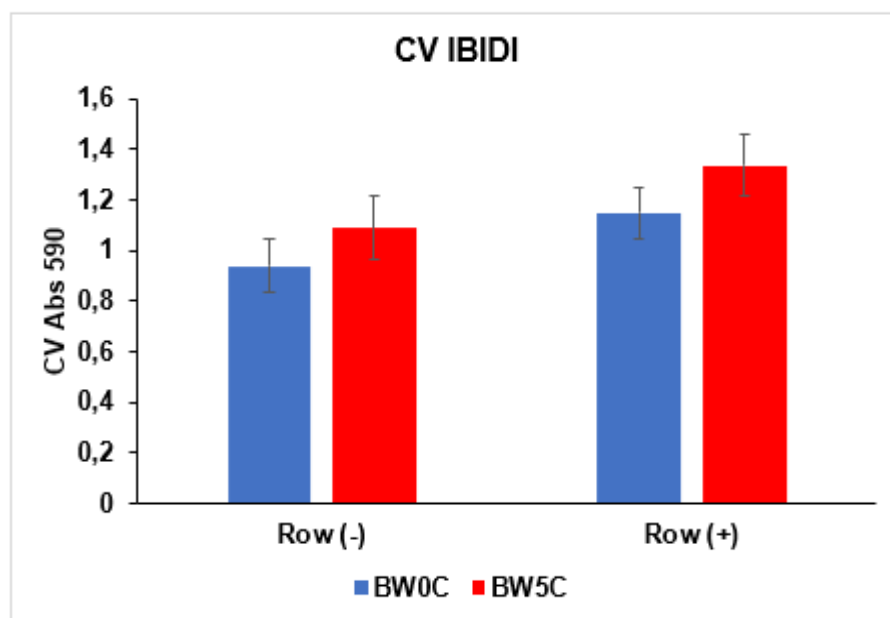
Se calculó también la tasa de supervivencia para cada réplica independiente, y la media de ambas [Tabla 5].

	PB-200221B		PB-200302		Media tasa de supervivencia		SD tasa de supervivencia	
	Row (-)	Row (+)	Row (-)	Row (+)	Row (-)	Row (+)	Row (-)	Row (+)
BW0C	22,12%	43,24%	9,29%	9,96%	15,70%	26,60%	9,07%	23,53%
BW5C	35,19%	54,89%	34,62%	41,45%	34,90%	48,17%	0,41%	9,50%

[Tabla 5]: Valores de las tasas de supervivencia de las muestras, media y desviación típica.

Células RPTEC-TERT1. Tasa de supervivencia estimada como la viabilidad tras 16h de tratamiento en hipoxia 1% entre la viabilidad antes del tratamiento. Valores expresados en porcentaje.

Para normalizar los resultados de viabilidad celular obtenidos también se cuantificó el número de células mediante un ensayo con Cristal Violeta, después de realizar el Presto Blue final. Los resultados se representan en la figura [Fig. 6], como la media de los valores de absorbancia de las dos réplicas independientes del experimento.



[Fig. 6]: **Comparación de los efectos de la isquemia y la hipoxia**

Células RPTEC-TERT1. Muestras 200221b, 200203. Medio sin glucosa (BW0C, azul), medio con glucosa (BW5C, rojo). "Row (-)": IBIDI estático, "Row (+)": IBIDI en balancín.

Células RPTEC-TERT1 sometidas a tratamiento con/sin suplementos. Estimación de la cantidad de células mediante Cristal Violeta (Sigma C0775) después de aplicar el tratamiento y de 16h sometidas a hipoxia 1%.

Datos representados como promedio de la absorbancia +/- error estándar de las muestras.

En la figura [Fig. 5] se observa cómo tras las 16h de hipoxia se reduce significativamente la viabilidad celular. Comparando las viabilidades de ambos IBIDI [Fig. 5] y [Fig. 6] podemos ver que, tanto en situación de hipoxia (BW5), como de isquemia (BW0), las células no sometidas a *shear stress* tienen una mayor mortalidad.

Estas relaciones se pueden observar mejor comparando las tasas de supervivencia [Tabla 5]. Comparando la situación de hipoxia con la de isquemia, vemos que, haya *shear stress* o no, la isquemia tiene efectos más negativos sobre la supervivencia celular.

Por tanto, los resultados muestran cómo la isquemia tiene efectos más negativos que la hipoxia sobre las células del túbulo proximal, y que la mortalidad se ve agravada en ausencia del estímulo del *shear stress*.

Discusión de los resultados

1. Efecto de los factores de crecimiento sobre la sensibilidad a hipoxia de las células RPTEC.

El objetivo del estudio era comprobar si los factores de crecimiento tienen algún efecto sobre la sensibilidad a hipoxia de las células RPTEC. La presencia y combinación de los suplementos en el medio de cultivo fomentan el crecimiento y supervivencia celular, teniendo efectos sobre diferentes factores, como la síntesis de componentes celulares, aumento del ciclo celular, etc. Consecuentemente, los resultados obtenidos muestran cómo aquellas células cultivadas en ausencia de factores de crecimiento tienen una menor viabilidad. Es decir, la ausencia de estos factores tiene un efecto negativo sobre la supervivencia de las células. Sin embargo, estas células mueren prácticamente en la misma proporción en situaciones de hipoxia que de normoxia, siendo la viabilidad ligeramente menor en el caso de la ausencia de factores de crecimiento. Por tanto, los factores de crecimiento, *a priori*, no tienen ningún efecto sobre la susceptibilidad a hipoxia de las células RPTEC.

No obstante, observando la tasa de supervivencia media [Tabla 4], vemos que ésta es superior al 75%, en el caso del cultivo con factores de crecimiento. Preferiblemente, para haber podido observar mejor los efectos, las tasas de supervivencia en el caso de las células cultivadas en medio BW5C tendrían que haber rondado el 50%. Las células permanecieron en hipoxia durante 16h, tiempo que se encuentra optimizado por el grupo de investigación para las células RPTEC cultivadas en IBIDI, y en este caso se trabajó en placas de 96 pocillos. Posteriores experimentos podrían realizarse aumentando el tiempo de incubación en hipoxia para que se alcanzase el 50% de la muerte celular, con el fin de comprobar si entonces aparecerán diferencias más notables.

2. Comparación de los efectos de la isquemia y la hipoxia.

En los resultados obtenidos se observa cómo la isquemia tiene efectos más negativos que la hipoxia sobre las células RPTEC, y que la ausencia del estímulo del *shear stress* agrava estos problemas.

El metabolismo de las células del túbulo proximal es principalmente aerobio, haciendo que éstas sean muy sensibles a las situaciones de baja concentración de oxígeno. En algunos estudios se ha observado cómo en estos casos las células cambian su metabolismo, aumentando su capacidad glucolítica (2). De esta forma, al no poder llevar a cabo el metabolismo oxidativo, las células obtienen energía de forma anaerobia por medio de la glucosa. Por otra parte, se ha visto cómo el efecto del *shear stress*, al que de normal se ven sometidas *in vivo* las células del túbulo proximal, aumenta la absorción de nutrientes y el transporte de iones (7). Los resultados obtenidos, por tanto, muestran coherencia con estos hechos. Las células cultivadas en medio sin glucosa sobreviven menos, pues no tienen el sustrato metabólico que necesitan para sobrevivir, como ocurriría en el caso de la isquemia, donde no hay suministro de nutrientes. Por su parte, el estímulo mecánico al que se someten las células, imitando el efecto del *shear stress*, aumenta la supervivencia celular. Se ha de destacar que la difusión del medio provocada por el balancín, además de producir un estímulo mecánico, también impide que las sustancias de desecho del metabolismo celular se acumulen sobre las células. La acumulación de estas sustancias puede tener efectos tóxicos sobre las células. Por tanto, cabría preguntarse si esta mayor supervivencia de las células incubadas sobre el balancín se debe a los efectos del *shear stress*, al impedimento de la acumulación de sustancias de desecho, o a una combinación de ambos.

Cabría tener en cuenta que este estudio ha sido realizado sobre cultivos celulares de túbulo proximal humano *in vitro*, procurando imitar las condiciones que se dan *in vivo*. Los resultados que se obtuvieran *in vivo* en futuros estudios similares podrían variar, pues puede haber diversos factores y condiciones implicados en los casos de hipoxia e isquemia, que son difíciles de reproducir en los modelos *in vitro*.

Conclusiones

Las conclusiones de este estudio han sido las siguientes:

1- Las células del túbulo proximal tienen un metabolismo esencialmente aerobio debido a sus altos requerimientos energéticos. Esto las hace muy susceptibles a situaciones

como la hipoxia o la isquemia, que a su vez son dos factores muy importantes en el desarrollo de enfermedades renales.

2- Se ha podido observar cómo, *a priori*, los factores de crecimiento de los medios de cultivo no tienen efectos de protección frente a la hipoxia sobre las células RPTEC.

3- Se ha evidenciado que la isquemia tiene consecuencias peores que la hipoxia sobre las células del túbulo proximal humano.

4- Es posible que en situaciones de baja concentración de oxígeno las células de túbulo proximal pasen a tener un metabolismo glucolítico como mecanismo de adaptación. Para confirmar este hecho habría que realizar un estudio sobre la expresión de enzimas glucolíticas o la presencia de sustratos intermedios de la ruta de degradación de la glucosa.

5- La difusión del medio sobre las células RPTEC tiene efectos positivos en ausencia de oxígeno. En futuros estudios cabría comprobar si esta mejora se debe a los efectos del *shear stress*, a que se evita la acumulación de sustancias de desecho, o a una combinación de ambas.

Conclusions

The conclusions in this essay were:

1- Proximal tubule cells' metabolism is essentially oxidative, due to their high energy demands. This makes them very sensitive to hypoxic and ischemic situations, that are two very important factors in the development of renal diseases.

2- It has been observed how, *a priori*, the culture media growth factors have no significant effects in the protection of RPTEC cells against hypoxia.

3- It has been shown that ischemia has worse consequences than hypoxia in proximal tubule cells.

4- It is possible that in low oxygen situations proximal tubule cells develop a glycolytic metabolism as an adaptative mechanism. In order to confirm this fact, we should take a closer look in the expression of glycolytic enzymes or the presence of intermediate substrates of glucose degradation pathway.

5- Media diffusion over RPTEC cells has positive effects in absence of oxygen. Further studies should verify whether this improvement is due to shear stress effect, to the non-accumulation of waste substances, or is a combination of both.

Referencias

1. Mårtensson J. Renal Energy Consumption and Metabolism [Internet]. Third Edit. Critical Care Nephrology: Third Edition. 2019. 59-64.e1 p.
2. Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. Nat Rev Nephrol [Internet]. 2017;13(10):629–46.
3. Forbes JM, Thorburn DR. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. Nat Rev Nephrol [Internet]. 2018;14(5):291–312.
4. Galvan DL, Green NH, Danesh FR. The hallmarks of mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease. Kidney Int [Internet]. 2017;92(5):1051–7.
5. Wang K, Kestenbaum B. Proximal tubular secretory clearance: a neglected partner of kidney function. Clin J Am Soc Nephrol. 2018;13(8):1291–6.
6. Klootwijk ED, Reichold M, Unwin RJ, Kleita R, Warth R, Bockenhauer D. Renal Fanconi syndrome: Taking a proximal look at the nephron. Nephrol Dial Transplant. 2015;30(9):1456–60.
7. Ren Q, Gliozzi ML, Rittenhouse NL, Edmunds LR, Rbaibi Y, Locker JD, et al. Shear stress and oxygen availability drive differential changes in opossum kidney proximal tubule cell metabolism and endocytosis. Traffic. 2019;20(6):448–59.
8. Yu ASL. Paracellular transport and energy utilization in the renal tubule. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2017;26(5):398–404.
9. Layton AT. Direct editorial correspondence to. 2018;(519).
10. Layton AT, Vallon V, Edwards A. Modeling oxygen consumption in the proximal tubule: Effects of NHE and SGLT2 inhibition. Am J Physiol - Ren Physiol. 2015;308(12):F1343–57.
11. Fromm M, Piontek J, Rosenthal R, Günzel D, Krug SM. Tight junctions of the proximal tubule and their channel proteins. Pflugers Arch Eur J Physiol. 2017;469(7–8):877–87.
12. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. Compr Physiol. 2012;2(2):1303–53.
13. Evans RG, Smith DW, Lee CJ, Ngo JP, Gardiner BS. What Makes the Kidney Susceptible to Hypoxia? Anat Rec. 2019;(May).

14. Balaban RS, Mandel LJ. Metabolic substrate utilization by rabbit proximal tubule. An NADH fluorescence study. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol*. 1988;254(3):407–16.
15. Dickman KG, Mandel LJ. Glycolytic and oxidative metabolism in primary renal proximal tubule cultures. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 1989;257(2).
16. Humes HD, Nguyen VD, Cieslinski DA, Messana JM. The role of free fatty acids in hypoxia-induced injury to renal proximal tubule cells. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol*. 1989;256(4).
17. Sakhrani LM, Badie-Dezfooly B, Trizna W. Transport and metabolism of glucose by renal proximal tubular cells in primary culture. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol*. 1984;15(6).
18. Portilla D. Energy metabolism and cytotoxicity. *Semin Nephrol*. 2003;23(5):432–8.
19. O'Connor PM. Renal oxygen delivery: Matching delivery to metabolic demand. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33(10):961–7.
20. Mimura I, Nangaku M. The suffocating kidney: Tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2010;6(11):667–78.
21. Szeto HH. Pharmacologic approaches to improve mitochondrial function in AKI and CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(10):2856–65.
22. Liu J, Kumar S, Dolzhenko E, Alvarado GF, Guo J, Lu C, et al. Molecular characterization of the transition from acute to chronic kidney injury following ischemia/reperfusion. *JCI insight*. 2017;2(18):1–18.
23. Bernardo EO, Cruz AT, Buffone GJ, Devaraj S, Loftis LL, Arian AA. Community-acquired Acute Kidney Injury Among Children Seen in the Pediatric Emergency Department. *Acad Emerg Med*. 2018;25(7):758–68.
24. Honda T, Hirakawa Y, Nangaku M. The role of oxidative stress and hypoxia in renal disease. *Kidney Res Clin Pract*. 2019;38(4):414–26.
25. Bulbul MC, Dagel T, Afsar B, Ulus NN, Kuwabara M, Covic A, et al. Disorders of lipid metabolism in chronic kidney disease. *Blood Purif*. 2018;46(2):144–52.
26. Palm F, Nordquist L. Renal tubulointerstitial hypoxia: Cause and consequence of kidney dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011;38(7):474–80.

27. Che R, Yuan Y, Huang S, Zhang A. Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2014;306(4).
28. Bataille A, Galichon P, Chelghoum N, Oumoussa BM, Ziliotis MJ, Sadia I, et al. Increased Fatty Acid Oxidation in Differentiated Proximal Tubular Cells Surviving a Reversible Episode of Acute Kidney Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(4):1338–51.
29. Lan R, Geng H, Singha PK, Saikumar P, Bottinger EP, Weinberg JM, et al. Mitochondrial pathology and glycolytic shift during proximal tubule atrophy after ischemic AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(11):3356–67.
30. Yu W, Wang ZHI, Li Y, Liu LEI, Liu J, Ding F, et al. Effects of autophagy and endocytosis on the activity of matrix metalloproteinase - 2 in human renal proximal tubular cells under hypoxia. 2017;3225–30.
31. Conde E, Giménez-Moyano S, Martín-Gómez L, Rodríguez M, Ramos ME, Aguado-Fraile E, et al. HIF-1 α induction during reperfusion avoids maladaptive repair after renal ischemia/reperfusion involving miR127-3p. *Sci Rep [Internet]*. 2017;7(December 2016):1–15.
32. Li S, Hafeez A, Noorulla F, Geng X, Shao G, Ren C, et al. Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia. *Prog Neurobiol [Internet]*. 2017;157:79–91.
33. Meng X, Tan J, Li M, Song S, Miao Y, Zhang Q. Sirt1: Role Under the Condition of Ischemia/Hypoxia. *Cell Mol Neurobiol*. 2017;37(1):17–28.
34. Simon-Friedt BR, Wilson MJ, Blake DA, Yu H, Eriksson Y, Wickliffe JK. The RPTEC/TERT1 Cell Line as an Improved Tool for In Vitro Nephrotoxicity Assessments. *Biol Trace Elem Res*. 2015;166(1):66–71.

Anexos

Reactivo	Referencia	Concentración	Número de suplemento
DMEM-F12 w/o glutamine, w/o HEPES (BW17)	BioWest L0090	-	-
DMEM-F12 w/o glutamine, w/o HEPES w/o glucose (BW0)	BioWest L0091	-	-
DMEM-F12 w/o glutamine, w/o HEPES (BW5)	(Elaborado a partir de BW0 y BW17)	5 mM (glucosa)	-
HEPES	Biochrom AG L 1613	10 Mm	-
Glutamax-I	Gibco 35050-038	2 mM	-
HEGF	Sigma E9644	10 ng/mL	1
T3	Sigma T6397	5 pM	2
L-ácido ascórbico	Sigma A4544	3,5 µg/mL	3
Holo transferrina	Merck 616424	5 µg/mL	4
Prostaglandina E1	Sigma P8908	25 µg/mL	5
Hidrocortisona	Sigma H0396	25 µg/mL	6
Selenito de sodio	Sigma S5261	8,65 µg/mL	7
G418	InvivoGen ant-gn-5	100 µg/mL	8
Insulina	Sigma I9278	5 µg/mL	9

[Anexo 1]: Referencias y concentraciones de los medios de cultivo y suplementos empleados en los cultivos celulares.